

УДК 577.24;577.217;577.25

## В ФОКУСЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФУНКЦИИ АНТИВОЗРАСТНОЙ ДЕАЦЕТИЛАЗЫ SIRT3

© 2022 Jarmila Nahálková

*Biochemistry, Molecular, and Cell Biology Unit, Biochemworld Co., 74394 Skyttorp,  
Uppsala County, Sweden; e-mail: jarmila.nahalkova@biochemworld.net*

Поступила в редакцию 11.11.2021

После доработки 20.12.2021

Принята к публикации 22.12.2021

Белок сиртуин 3 (SIRT3) представляет собой лизиндеацетилазу, играющую важную роль в поддержании целостности митохондрий, являющихся уязвимой мишенью при многих заболеваниях. Интересно, что клеточное старение может быть обращено только лишь путём суперэкспрессии SIRT3, что вызывает много вопросов о роли SIRT3 в молекулярных механизмах борьбы со старением. Анализ функционирования SIRT3 мы провели на основе имеющихся данных по взаимодействию 407 субстратов этого белка. Результаты изучения многообразия путей и прогнозирования функций генов подтвердили роль SIRT3 в первичном метаболизме и производстве АТФ митохондриями. Кроме того, SIRT3, предположительно, задействован в термогенезе, при развитии дегенеративных заболеваний головного мозга, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, а также неалкогольной жировой болезни печени. Приоритизация белков в узлах исследуемого пути продемонстрировала, что субъединицы комплекса I дыхательной цепи митохондрий (MRC) являются основными регуляторными точками во всей сети взаимодействий. Дополнительными приоритетными узлами оказались субъединица сукцинатдегидрогеназы В (SDHB) комплекса II и ATP5F1 комплекса V MRC. Проведенный анализ подтверждает существование NADH/NAD<sup>+</sup>-зависимой регуляторной петли обратной связи между SIRT3, комплексом I MRC и ацетил-КоА-синтетазами, а также наличие ядерных субстратов SIRT3. Малоисследованные функции субстратов SIRT3, таких как LMNA и LMNB, HIF-1 $\alpha$ , p53, DNA-PK и PARK7, отмечены как перспективные для дальнейших научных исследований. SIRT3 действует как репрессор BACE1 через SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-BACE1 (SIRT3-BACE1), функции которого наилучшим образом соответствуют механизмам циркадного ритма. Формируется новая рабочая гипотеза терапевтической мишени для лечения болезни Альцгеймера. Также обозначены другие важные пути терапевтических вмешательств, ассоциированные с активностью SIRT3.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** SIRT3, NAD<sup>+</sup>-зависимая деацетилаза, сеть белковых взаимодействий, анализ обогащения путей, старение, дыхательная цепь транспорта электронов, митохондрии, возрастные заболевания.

DOI: 10.31857/S0320972522020105

### ВВЕДЕНИЕ

Обращение вспять процесса старения или, по крайней мере, его отсрочка – очень амбициозная задача для многих поколений ученых. С точки зрения общественного здравоохранения, желаемым результатом была бы не возможность продления общей продолжительности жизни человека, а сохранение здоровья людей пожилого возраста.

Принятые сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; БП – болезнь Паркинсона; БХ – болезнь Хантингтона; НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени; ТБЖ – ткань бурого жира; цикл ТСА – цикл трикарбоновых кислот; APP – предшественник бета-амилоида; BACE1 – бета-секретаза 1; СС – циркадные часы (circadian clock); CR – ограничение калорий (calorie restriction); LMNA – ламин А/С; MRC – дыхательная цепь митохондрий; NHEJ – неомологичное соединение концов; OXPHOS – окислительное фосфорилирование; PDH – пируватдегидрогеназа; ROS – активные формы кислорода; wt – дикий тип.

Семейство белков-сиртуинов известно благодаря его функциональной связи со старением и возрастными заболеваниями, а также особым свойствам сиртуина 3 (SIRT3), NAD<sup>+</sup>-зависимой лизиндеацетилазы, играющей важную роль в защите целостности митохондрий. Эксперименты на SIRT3-нокаутных (SIRT3 KO) мышцах продемонстрировали гиперацетилирование большинства митохондриальных белков этих мышечных, тем самым подтверждая роль SIRT3 как основной митохондриальной деацетилазы [1]. Нокаутные по SIRT3 мышцы демонстрируют потенциальную активность этого белка в контексте возрастных заболеваний, поскольку у этих животных развивается целый ряд болезней, включая рак, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания, а также нарушения метаболизма [2]. Такие мышцы демонстрируют изменения энергетики митохондрий и синтеза АТФ, сопровождающиеся повышенным ацетилированием митохондриальных белков, вклю-

чая Mn-зависимую супероксиддисмутазу, которая в таком состоянии теряет способность защищать от возросшего количества активных форм кислорода (ROS). Этот процесс в конечном счете приводит к канцерогенезу, и, таким образом, SIRT3 действует как опухолевый супрессор, поскольку его отсутствие запускает онкогенез [3]. SIRT3 играет решающую роль в регулировании биоэнергетики митохондрий, которая активируется питательными веществами и физическими упражнениями [4]. Уровень экспрессии сиртуина 3 снижается в сенесцентных стволовых клетках человека (HSC-s) [5], в клетках лобных долей и гиппокампе старых крыс [6]. Интересно, что старение клеток HSC может быть обращено только лишь путем сверхэкспрессии SIRT3, что свидетельствует о важной роли этого белка в клеточных механизмах борьбы со старением [5]. SIRT3 также действует как нейропротектор, защищая митохондрии путем подавления продукции ROS, предотвращая снижение мембранного потенциала в митохондриях, а также выступая в роли сенсора нейротоксических воздействий в моделях болезни Альцгеймера (БА) на крысах и в тканях головного мозга при БА [7].

Для изучения молекулярного механизма действия SIRT3 в процессе старения в настоящей работе исследуются взаимодействия SIRT3 с его субстратами. При анализе мы использовали предположение, что прямые взаимодействия белок-белок говорят об их участии в одних и тех же заболеваниях, и что взаимодействующие белки с высокой степенью достоверности участвуют в идентичных клеточных и молекулярных реакциях [8]. В работе мы использовали анализ обогащения молекулярных путей с использованием сервиса GeneMania, работающего в среде Cytoscape, который был дополнен онлайн-анализом STRING. С помощью приложений CytoHubba и CODE мы определили высокоприоритетные белковые комплексы (узлы пути) и кластеры с основными регуляторными функциями. Результаты анализа обсуждаются в рамках антивозрастных функций фермента и его роли в работе митохондрий при возрастных заболеваниях. Активность SIRT3 в качестве репрессора бета-секретазы 1 (BACE1) посредством пути SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-BACE1 (SIRT3-BACE1) позволила сформировать новую рабочую гипотезу касательно регуляции BACE1, которая является одной из основных терапевтических мишеней при БА. Наиболее важные сигнальные и метаболические пути, связанные с активностью SIRT3, выделены в настоящей работе с целью дальнейших исследований способов регулирования ее активности и разработки терапевтических вмешательств.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Список субстратов SIRT3.** Субстраты SIRT3 были подобраны из литературных источников [4, 9–29], которые, в частности, включали крупномасштабные протеомные исследования [30–32] (табл. S1 и S2 в Приложении). В одном из исследований были выявлены дифференциально ацетилированные митохондриальные белки, выделенные из печени мышей дикого типа (wt) и нокаутных по SIRT3 мышей (SIRT3 KO) с помощью жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ЖХ/МС). Для анализа были отобраны субстраты SIRT3 с двукратным повышением уровня ацетилирования у мышей SIRT3 KO по сравнению с мышами дикого типа ( $p = 0,01$ ) [30]. Затем была использована наносистема ЖХ/МС с обращенной фазой для идентификации субстратов SIRT3 из митохондриального ацетилома печени мышей дикого типа и SIRT3 KO. Для дальнейшего анализа были выбраны белки с минимум 2-кратным повышением уровня ацетилирования в SIRT3 KO мышцах по сравнению с мышами дикого типа ( $t$ -критерий Уэлча с поправкой Стори  $< 0,01$ ) [31]. Наконец, были включены субстраты из исследований SILAC по дифференциальному ацетилированию белков SIRT3 KO мышей и эмбриональных фибробластов wt мышей, а также клетки U2OS с ретровирусной гиперэкспрессией SIRT3 в сравнении с клетками с сайленсингом SIRT3 с использованием shRNA (короткие шпилечные РНК). Дифференциальным порогом было установлено 2-кратное изменение уровня ацетилирования для отношений SIRT3 KO/wt и SIRT3 KO/SIRT3 [32]. В окончательный список субстратов SIRT3, использованных для анализа, вошли 407 белков (табл. S2 в Приложении).

**Анализ GeneMania.** Названия белков-субстратов SIRT3 были заменены на совместимые с GeneMania идентификаторы с использованием баз данных UniprotKB [33] и OMIM® (Online Mendelian Inheritance in Man®) [34]. Анализ с использованием GeneMania (3.5.2) [35–37] был выполнен в среде Cytoscape (3.7.2) [38] при помощи преобразованного списка идентификаторов субстратов SIRT3, в качестве запроса был введен SIRT3 (табл. S2 в Приложении). В анализе использовали базу данных для *H. sapiens* (обновление 13-07-2017) с включением всех типов взаимодействий. Целью поиска было выявление 20 основных ассоциированных генов и максимум 20 характерных признаков с использованием GO Molecular function weighting. Этот метод был выбран на основе высокой вероятности совпадения молекулярных функ-

ций у субстратов SIRT3, поскольку в сети 408 белков (включая SIRT3) было выявлено 1230 белок-белковых взаимодействий [8]. Категория результатов «Consolidated pathways» («Консолидированные пути») представляет собой результат анализа обогащения путей, который в дальнейшем будет использован в обсуждении.

**STRING-анализ** (v. 11) [39] был выполнен онлайн с использованием списка субстратов SIRT3 (табл. S2 в Приложении) в качестве запроса по множеству белков в базе данных *H. sapiens*. Использовались следующие настройки: источники поиска активных взаимодействий – текстовый анализ, эксперименты и базы данных; минимальный уровень оценки взаимодействия – наивысшая вероятность (0,9); максимальное число взаимодействий, определяющих 1-ю и 2-ю границы – нет. Результаты анализа функционального обогащения были экспортированы со значением False Discovery Rate (FDR), меньшим или равным 0,05. Сеть взаимодействия была сгруппирована по методу кластеризации Markov Cluster Algorithm (MCL) [40] с инфляционным значением, равным 10.

**Приоритизация белковых узлов.** Высокоприоритетные белковые узлы и пути в сети субстратных взаимодействий SIRT3, построенной GeneMania, были предсказаны с использованием CytoHubba (0.1) [41]. Приложение было создано для использования топологического метода Maximum click centrality (MCC), который, по мнению разработчиков, обеспечивает наивысшую точность в предсказании комплексов с максимальным приоритетом [41]. Согласно выбранной настройкам, проводился поиск комплексов первой ступени и демонстрация кратчайшего пути. Комплексы первой ступени представляют собой белковые узлы, взаимодействующие непосредственно с искомыми белками.

**Кластерный анализ.** Кластеры белковых комплексов, демонстрирующие высокую степень взаимодействия, и которые с большой вероятностью представляют собой функциональные комплексы, были определены с помощью приложения MCODE к Cytoscape (v. 1.6) [42]. Для анализа были использованы следующие программные настройки: Network scoring – Degree Cutoff: 2; Cluster finding – Haircut; Node score cutoff: 0.2; K-Core: 2; Max. Depth: 100.

**Визуализация путей.** Визуализация путей была осуществлена с помощью базы знаний приложения WikiPathways [43], работающего в среде Cytoscape (3.9.0) [38], а также с использованием ссылок на литературу, упомянутых в тексте. Рисунки были созданы с помощью Adobe Illustrator 2020 (24.2.1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

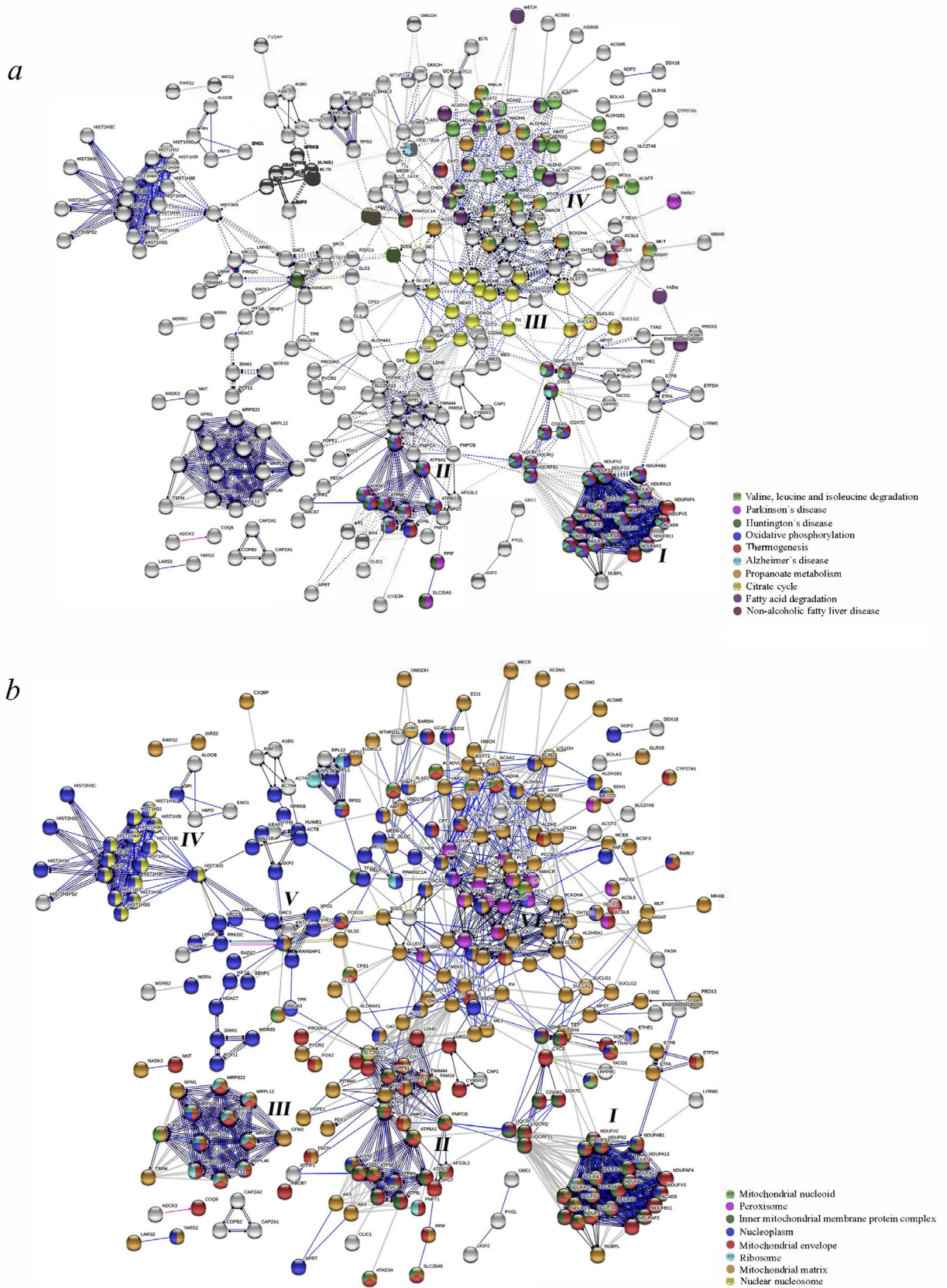
В настоящей работе мы исследовали анти-возрастные функции основного митохондриального белка, деацетилазы SIRT3, в контексте потенциальных терапевтических вмешательств. Основная цель состояла в разработке рабочей гипотезы, основанной на анализе больших данных, которая в дальнейшем может быть использована в экспериментальных исследованиях, связанных со старением.

Антивозрастная функция SIRT3 была продемонстрирована на HSC-s, в которых указанный белок способствует выживанию клеток в условиях окислительного стресса и омоложению фенотипа [5]. В молодых клетках уровень экспрессии SIRT3 является высоким, однако он снижается со старением клеток и тканей, что приводит к повышению уровня ROS и окислительным повреждениям [6, 44]. Мыши SIRT3 KO демонстрируют значительный спектр заболеваний, ассоциированных со старением [2]. Ввиду упомянутого антивозрастного эффекта SIRT3 [5], фармакологическая активация его экспрессии и регуляция функционально связанных путей являются очень востребованными в контексте разработки антивозрастной терапии.

В настоящей работе исследуются взаимодействия в сети белковых субстратов SIRT3, для чего был применен анализ функционального обогащения, предсказание функции белка, приоритизация белковых узлов и методы кластеризации (рис. 1 и 2, табл. 1). Анализ сети взаимодействий применяется для выявления наиболее важных молекулярных функций, ассоциированных с деацетилирующей активностью SIRT3. Использование искусственного интеллекта особенно полезно для извлечения информации из ограниченных литературных источников, которая может ускользнуть от внимания при рутинном анализе данных. На основе полученной информации могут быть выдвинуты новые гипотезы и сделаны выводы, потенциально имеющие значение в дальнейших экспериментальных исследованиях.

Приоритизация белковых узлов проводится с целью выявления белковых узлов и кластеров в сети взаимодействия, имеющих важные регуляторные роли. Внимание также уделяется субклеточной локализации субстратов SIRT3, что важно при интерпретации функционала SIRT3 в различных клеточных компартментах. Также была построена модель регуляции уровня BACE1 путем активации SIRT3, которая может быть использована при исследовании потенциальной терапии при БА.

**Система взаимодействия SIRT3–субстрат.** В настоящей работе используется приложение



**Рис. 1.** Анализ обогащения путей в сети взаимодействия субстратов SIRT3, выполненный с использованием приложения STRING. *a* – Пути KEGG; *b* – GO категория «клеточные компоненты». Анализ был выполнен с использованием списка субстратов SIRT3 в качестве множественного запроса по базе данных *H. sapiens*

GeneMania в среде Cytoscape, аналитический инструмент для исследования обогащения и прогнозирования функций генов, основанный на объединенных геномных и протеомных данных, а также данных по экспрессии мРНК [35, 36, 45].

Программа позволяет провести сопоставление проверяемых субстратов с предсказанными и экспериментально подтвержденными физическими белок-белковыми взаимодействиями, генетическими взаимодействиями, результатами исследований по колокализации и коэкспрессии. Наконец, она подходит для известных сигнальных и метаболических сетей. Одним из преимуществ приложения GeneMania является его интеграция со средой Cytoscape, которая позволяет эффективно конструировать сети взаимодействий. База данных GeneMania постоянно обновляется и пополняется новой информацией [37], что не всегда происходит с другими типами платформ по анализу взаимодействий в путях.

Результаты GeneMania соответствовали известным наиболее важным функциям системы взаимодействия субстратов с SIRT3, которые связаны с дыхательной цепью переноса электронов; основными метаболическими путями; метаболизмом жирных кислот, триацилглицеридов и кетоновых тел; в то же время ассоциация с болезнью Альцгеймера и Хантингтона

имела более низкий ранг (табл. 1). Дополнительно была проведена приоритизация белковых узлов с помощью CytoHubba. Субъединицы NADH:убихинон оксидоредуктазы, представляющие комплекс I дыхательной цепи митохондрий (MRC), были определены как узлы с наивысшим рангом (рис. 2). Это говорит о критической важности их роли в регулировании взаимодействий SIRT3 и его субстратов (табл. 1). Также высокий ранг был присвоен субъединице В сукцинатдегидрогеназы (SDHB) комплекса II, а также *ATPF1*, кодирующему субъединицу В АТФ-синтазы F0 в комплексе V MRC. Кластерный анализ с применением MCODE выявил среди наиболее важных групп приоритетную подсистему из 70 узлов, участвующих в окислительном фосфорилировании (OXPHOS), в дыхательной цепи переноса электронов, а также ассоциированную с развитием БА и болезни Хантингтона (БХ) (данные не показаны); указанная подсистема определяет основные регуляторные узлы в общей системе взаимодействий пути.

Анализ GeneMania был в дальнейшем дополнен при использовании анализа функционального обогащения с применением онлайн базы данных STRING, что привело к получению прочно связанной сети белок-белковых взаимодействий субстратов SIRT3 (рис. 1). Алгоритм дополняет базу данных о белках-субстратах SIRT3, используя данные об известных взаимо-

**Таблица 1.** Результат анализа обогащения путей и прогнозирования функции гена в сети взаимодействия субстратов SIRT3 с использованием приложения GeneMania в среде Cytoscape (3.7.2). Анализ был проведен с использованием базы данных *H. sapiens* (обновление 13-07-2017) с включением всех типов взаимодействий

Консолидированный путь	Ранг*	Описание базы данных
Дыхательная цепь переноса электронов	19,38	Reactome React 22393.2 дыхательная цепь переноса электронов
Метаболические пути	7,56	KEGG hsa01100 метаболические пути
Метаболизм жирных кислот, триацилглицеридов и кетоновых тел	5,56	Reactome React 22279.2 метаболизм жирных кислот, триацилглицеридов и кетоновых тел
Окислительное фосфорилирование	4,93	KEGG hsa00190 окислительное фосфорилирование
Метаболизм	2,54	Reactome React 111217.2 метаболизм
Метаболизм жирных кислот	2,33	KEGG hsa00071 метаболизм жирных кислот
Болезнь Альцгеймера	1,23	KEGG hsa05010 болезнь Альцгеймера
Метаболизм аминокислот и их производных	0,44	Reactome React 13.4 метаболизм аминокислот и их производных
Болезнь Хантингтона	0,13	KEGG hsa05016 болезнь Хантингтона

Примечание. Анализ был проведен с использованием базы данных *H. sapiens* (обновление 13-07-2017) и включением всех типов взаимодействий.

\* Ранг (вес) показывает прогностическую ценность, присвоенную GeneMania в отношении того, насколько указанные пути соответствуют набору данных, указанных в запросе, по сравнению другими данными (вне запроса).



(SDHA) и субъединицу В (SDHB), комплекс II MRC. Результаты настоящей работы согласуются с результатом процессирования сиртуином 3 субъединиц комплекса II, предложенным некоторыми авторами [51]. Физическое взаимодействие SIRT3 и SDHB было также продемонстрировано в двух других независимых экспериментах, однако без обнаружения специфических сайтов ацетилирования [52]. В другой работе сообщается, что деацетилирование SDHA SIRT3 оказывает лишь ограниченное стимулирующее действие на активность всего комплекса II [53], либо оно вообще отсутствует [49]. Упомянутая ограниченность в регуляция путем ацетилирования все же имеет смысл, потому что комплекс II MRC является важным ферментативным комплексом, и полная его инактивация является летальной [53].

Кластер II включает субстраты, ассоциированные с БА, БП и БХ, которые также играют роль в процессах термогенеза и OXPHOS (рис. 1, а). Кластер состоит из субъединиц АТФ-синтазы (комплекс V), последнего фермента в цепи окислительного фосфорилирования митохондрий, который производит клеточную энергию в форме АТФ путем хемиосмотического выброса протонов. Повышенное ацетилирование субъединиц фермента происходит в митохондриях печени и мышц SIRT3 KO мышей, когда у животных наблюдается недостаточная выработка митохондриального АТФ [4]. Это указывает на то, что SIRT3 деацетилирует и фактически регулирует активность комплекса V MRC. С другой стороны, SIRT3, стимулируемый питательными веществами, ограничением калорий (CR) и физическими упражнениями, деацетилирует субъединицы АТФ-синтазы а, b, c, d и OSCP, что приводит к увеличению энергоснабжения митохондрий и антивозрастным эффектам [4]. Поразительно, что SIRT3 необходим для поддержания мембранного потенциала здоровых митохондрий, где он связан с АТФ-синтазой через уровень рН и стресса [54]. Связь между SIRT3 и АТФ50 может быть нарушена при изменении потенциала внутренней митохондриальной мембраны, но не при ингибировании активности АТФ-синтазы при синтезе АТФ. Вместо этого АТФ50 является одним из субстратов SIRT3 (табл. S2 в Приложении) и, как и в случае других субъединиц АТФ-синтазы (табл. 2, строки 59–68), его активность регулируется посредством деацетилирования SIRT3, что позволяет предположить, что связывание опосредовано взаимодействиями фермент-субстрат. Мембранный потенциал митохондрий зависит от SIRT3, поскольку после его падения он быстро восстанавливается в клетках wt HeLa,

но не в клетках SIRT3 KO [54]. Субъединица АТФ5F1 является одним из приоритетных узлов в системе взаимодействия SIRT3-субстрат (рис. 2), которая, параллельно с деацетилированием других субъединиц комплекса V MRC, демонстрирует важнейшую роль в биоэнергетике митохондрий.

Кластер III состоит из ферментов, участвующих в цикле трикарбоновых кислот, не связанных в сети через STRING ни с одной из основных болезней (рис. 1, а), однако имеющих большое значение в развитии онкологических заболеваний и БА. Метаболизм глюкозы в мозге сильно нарушается при БА, причем ферменты цикла TCA с максимальным снижением уровня стоят выше (upstream) от сукцинил-КоА в метаболическом пути [55]. PDHX, PDHB, PDHA1 (рис. 1, а, кластер III) являются субъединицами ферментативного комплекса пируватдегидрогеназы (PDHC), который участвует в первой и необратимой ферментативной реакции на стадии, соединяющей гликолитический цикл и TCA, превращая пируват в ацетил-КоА. SIRT3 активирует субъединицу фермента PDHA1 путем ее деацетилирования, что имеет важное значение для регуляции эффекта Варбурга в раковых клетках [56, 57]. Отложения бета-амилоида (Аβ) в мозге при БА вызывают повышенное фосфорилирование PDHC, приводящее к снижению продукции энергии из-за смены режима метаболизма, а именно, перехода от OXPHOS к гликолизу. В связи с этим ограничением в метаболизме альтернативная энергия вырабатывается путем обратной ферментативной реакции, превращающей оксалоацетат в сукцинат, и с помощью цепи переноса электронов в комплексе I [58]. Ассоциированная с возрастом стимуляция киназы пируватдегидрогеназы (PDK) инактивирует PDHC посредством ее фосфорилирования, и возникающий в результате дефицит продукции АТФ приводит к повреждению митохондрий и ухудшению функции синапсов [59]. Поскольку экспрессия SIRT3 имеет тенденцию к снижению в стареющих клетках и тканях [5, 6], то старение связано со снижением выработки митохондриальной АТФ из-за снижения активности OXPHOS.

Кластер IV образован субстратами SIRT3, участвующими в распаде жирных кислот и в метаболизме аминокислот с разветвленной цепью (рис. 1, а). Повышенное ацетилирование пируватдегидрогеназы у мышей SIRT3 KO приводит к метаболическому переключению за счет повышенного окисления жирных кислот и накопления лактата в мышцах [24]. Это также вызывает гиперацетилирование длинноцепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы, что приводит к накопле-

нию длинноцепочечных жирных кислот как промежуточных продуктов метаболизма [20]. Это говорит о том, что активность деацетилирования SIRT3 оказывает более широкое регулирующее действие, включая не только метаболизм глюкозы, но и метаболизм жирных кислот и разветвленных аминокислот.

**Субклеточная локализация SIRT3 и его субстратов.** При том, что в основном деацетилаза описывается как митохондриальный белок, существуют разногласия по поводу субклеточного расположения SIRT3 в других компартментах. Согласно некоторым сообщениям, SIRT3 перемещается между ядром и митохондриями при воздействии клеточного стресса или сверхэкспрессии. Прежде чем он будет экспортирован в митохондрии, SIRT3 подвергается *N*-концевому отщеплению 142 аминокислотных остатков [60]. Ядерная локализация SIRT3, однако, ранее подвергалась сомнению некоторыми авторами, поскольку деацетилаза, согласно их экспериментам, является исключительно митохондриальным ферментом [61, 62].

Чтобы оценить локализацию внутриклеточной активности SIRT3, данные STRING о сети взаимодействия субстратов SIRT3 классифицировали с помощью GO категории «клеточный компартмент». Результаты продемонстрировали четыре основных субклеточных компартмента в качестве мест расположения субстратов SIRT3. Ими были ядро, митохондрии, цитоплазма и пероксисомы (рис. 1, *b*). Большинство субстратов SIRT3 были также локализованы в цитоплазме (данные не показаны), за исключением гистоновых белков. Субстраты SIRT3, используемые для анализа данных, были получены в результате анализа митохондриальных фракций [30, 31], где, соответственно, митохондриальные белки представлены в больших количествах. Исключением является исследование SILAC [32] (табл. S1 в Приложении), в котором лизировали цельные клетки и исследовали методами ЖХ/МС. Список субстратов SIRT3, полученный в результате этого исследования, содержит множество гистоновых белков (рис. 1, *b*), в то время как их присутствие в списках субстратов из других источников [30, 31] ограничено.

Интересно, что кластеры I и II (рис. 1, *b*) содержат как митохондриальные, так и ядерные субстраты SIRT3. Субъединицы дыхательной цепи переноса электронов комплекса I (NDUFS1–3, NDUFS6), субъединица 9 ацил-КоА дегидрогеназы (ACAD9) и NDUFB1 расположены как в митохондриях, так и в нуклеоплазме. Субъединица В периферической мембраны АТФ-синтазы (ATP5F1) также локализована в нуклеоплазме, митохондриальной мембране и

митохондриальной матриксе (рис. 1, *b*). PNPT1 участвует в производстве митохондриальной мРНК, а полиаденилирование проходит в митохондриальных рибосомах и митохондриальной оболочке [63]. SLC25A13, митохондриальный переносчик кальция, локализующийся в митохондриальном матриксе и митохондриальном нуклеоиде, транспортирует цитоплазматический глутамат через внутреннюю митохондриальную мембрану для создания источника митохондриального аспартата [64] (рис. 1, *b*).

Кластер III включает митохондриальные белки, кодируемые в ядре и локализованные в различных митохондриальных компартментах (рис. 1, *b*). Субстраты SIRT3 GFM1, GFM2 и TSFM, включенные в эти кластеры, являются митохондриальными факторами элонгации, важными для трансляции белка в митохондриях, и они локализованы в митохондриальном матриксе. Их мутации являются причиной митохондриальных заболеваний, вызванных дефицитом MRC [65–67]. Другой фактор элонгации трансляции, TUFM, локализован как в матриксе, так и в нуклеоидах митохондрий (рис. 1, *b*) [68]. Было продемонстрировано, что SIRT3 регулирует трансляционную активность митохондриальных рибосом [19]. Митохондриальные рибосомные белки MRPL10, MRPL11, MRPL12, MRPL45, MRPL46, MRPS22, MRPS26, MRPS30 и MRPS9, входящие в этот кластер, кодируются ядерной ДНК.

Кластер IV содержит ядерные гистоновые белки и несколько белков нуклеоплазмы (рис. 1, *b*). Ферментативно активный SIRT3 выполняет функцию сайленсинга путем деацетилирования H4K16Ac, H3K9Ac [60] и H3K56Ac [69], что также свидетельствует в пользу наличия активного SIRT3 в ядре. Интересно, что совместная экспрессия SIRT3 и SIRT5 приводит к его перемещению из митохондрий в ядро [70]. Среди сиртуинов SIRT3 обладает наилучшей способностью к освобождению β-гидроксibuтирила (bhb) от ядерного субстрата H3K9bhb [63], а также деацетилированию ядерного субстрата H3K56 [64].

Кластер V включает несколько значимых субстратов SIRT3 с интересными молекулярными функциями, которые локализованы в нуклеоплазме: в частности, LMNA, LMNB и HIF-1α, p53 и PRKDC, на которых остановимся далее. LMNA как субстрат SIRT3 был выявлен при помощи метода SILAC в клетках U2OS, сверхэкспрессирующих SIRT3 в отличие от нокаутных клеток, в то время как LMNB был обнаружен идентичной методикой в SIRT3 KO MEF при сравнении с клетками wt (табл. S1 в Приложении) [32]. Интересно, что, подобно связанным



со старением функциям SIRT3, мутации его субстрата LMNA вызывают синдром преждевременного старения, синдром прогерии Хатчинсона–Гилфорда [71]. Интересно, что ацетилирование K134 LMNB1 опосредует стабильность ядра и клеточного цикла. Оно индуцирует стойкую активацию контрольной точки повреждения ДНК в фазе G1/S, остановку клеточного цикла в фазе G1, отрицательно регулирует аномальное каноническое негомологичное соединение концов (cNHEJ) и вызывает активацию связывания LMNB1 с периферическими белками ядра [72]. Клетки с делетированным LMNA/C также демонстрируют аберрации в репарации удаленных оснований ДНК (BER) [73], репарации двуникового разрыва ДНК (DSB) и гомологичной рекомбинации (HR) [71]. В связи с широким спектром интересных функций ламин и практически отсутствием информации об их деацетилировании соответствующие исследования SIRT3 заслуживают внимания.

Еще одним важным субстратом, включенным в этот кластер, является HIF-1 $\alpha$  (табл. S1 в Приложении) [32], который также деацетируется SIRT1 в позиции K674 [74]. SIRT3 является важнейшим регулятором метаболизма раковых клеток, поскольку он опосредует переход метаболизма на гликолиз путем дестабилизации HIF-1 $\alpha$  посредством его деацетилирования. Нокаут приводит к росту уровня ROS, стабилизирует HIF-1 $\alpha$  и усиливает эффект Варбурга, в то время как сверхэкспрессия действует как супрессор опухоли путем ингибирования гликолиза и пролиферации раковых клеток [13, 75].

Другим важным субстратом, входящим в этот кластер, является p53, классический супрессор опухолей, который уже был идентифицирован как субстрат SIRT3 в раковых клетках с дефицитом PTEN [76]. Удивительно, но весь биологический процесс нейродегенерации может быть обращен вспять лишь за счет увеличения экспрессии SIRT3, поскольку при коэкспрессии с p53 сиртуин 3 предотвращает повреждение митохондрий нейронов [77]. Активация SIRT3 может приводить к эффективному снижению уровня повреждений при нейродегенерации, вызванной повышением p53, что является перспективным в контексте разработки терапии.

Еще один важный субстрат, ДНК-зависимая протеинкиназа (PRKDC, DNA-ПК) [30, 32] является ядерным ферментом, участвующим в соединении концов при репарации двуникового разрыва ДНК (NHEJ) [78, 79]. DNA-ПК также участвует в сохранении длины теломер и их защите, что имеет большое значение как при раке, так и при старении. В процессе старения, когда накапливаются разрывы ДНК, активация

DNA-ПК приводит к снижению биоэнергетики митохондрий и физической формы мышц [80, 81]. Схожим с SIRT3 является эффект диеты с ограничением калорий (CR, calorie restriction) и аэробных упражнений, которые могут снижать активность пируваткиназы в процессе старения [80]. С другой стороны, SIRT3 стимулируется питательными веществами, ограничением калорий и физическими упражнениями, что приводит к функциональной активации митохондрий и антивозрастным эффектам [4]. Функциональные последствия деацетилирования SIRT3 DNA-ПК в производстве энергии митохондриями и механизмах репарации ДНК неизвестны, хотя и могут быть частично предсказаны по основным функциям. Это могло бы стать интересным предметом для дальнейших научных исследований.

Деацетилирование PARK7 также может быть потенциально интересным для дальнейшего экспериментального изучения. Мутации в гене PARK7 являются причиной БП с ранним началом [82], заболеванием, тесно ассоциированным с сетью взаимодействий SIRT3 с субстратами (рис. 1, а).

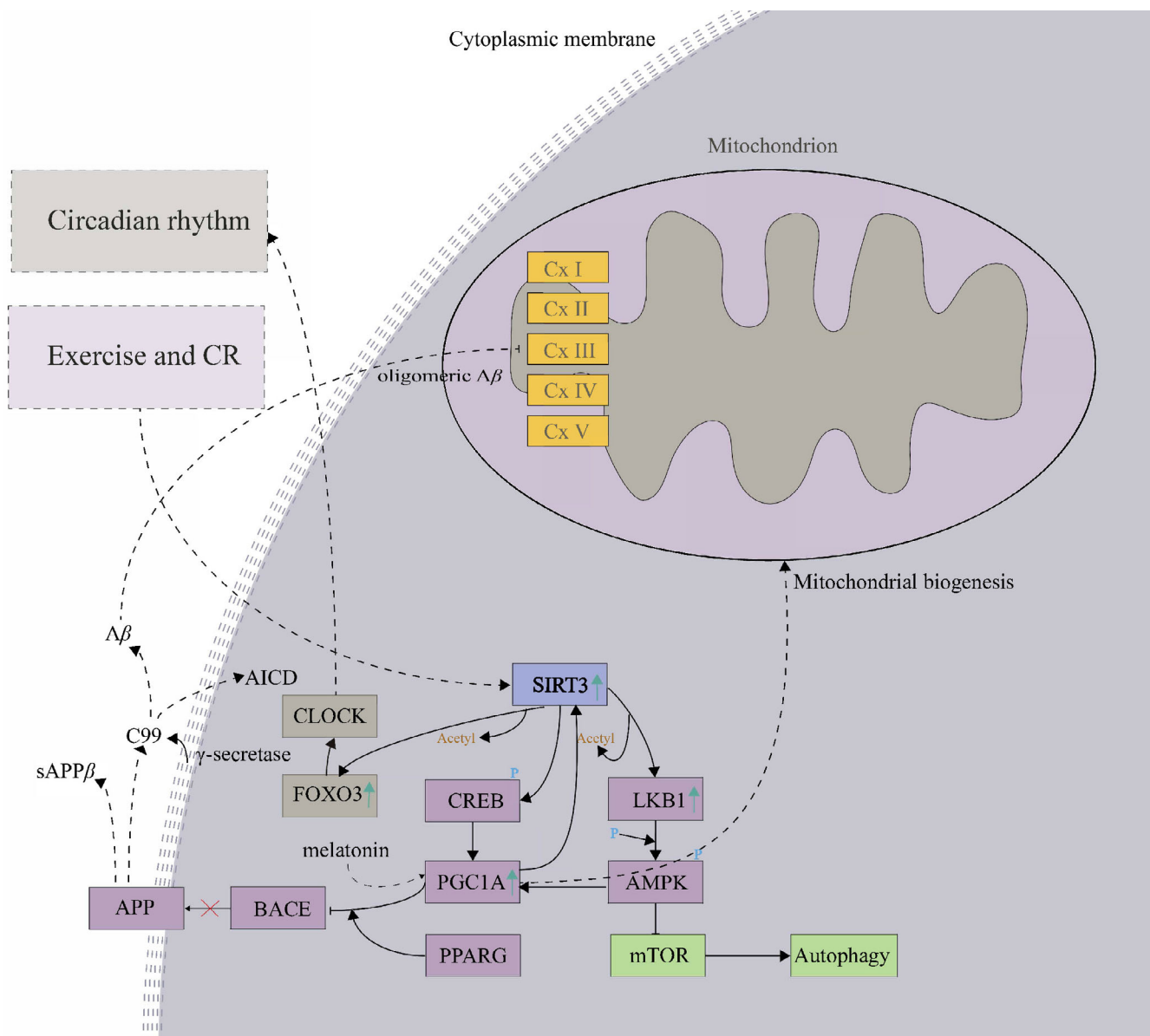
Кластер VI характеризуется молекулярными функциями, ассоциированными с инактивацией ROS и  $\beta$ -окислением жирных кислот, а также уникальной пероксисомной локализацией, требующей экспериментальной проверки. Субстраты могут сначала быть обработаны в митохондриях и ядрах, а затем перемещаться в пероксисомы. Это наблюдение подтверждается существованием участков мембранного контакта пероксисом с другими органеллами, включая митохондрии и ядра [83].

Наконец, отобранные субстраты SIRT3 были отсортированы по отдельным кластерам на основе их субклеточной локализации в митохондриальных, ядерных и пероксисомных компартментах. Помимо группы исключительно ядерных субстратов, гистонов, другие кодируемые в ядре белки с важными митохондриальными функциями деацетируются SIRT3. Настоящая работа подтверждает экспериментальные наблюдения о том, что SIRT3 взаимодействует также с субстратами в ядре, а не исключительно в митохондриях. Несколько новых ядерных субстратов SIRT3 с потенциально интересными биологическими функциями, включая LMNA, LMNB, HIF-1 $\alpha$ , DNA-ПК и PARK7, отобраны для дальнейших экспериментальных исследований. Слияние пероксисомной мембраны с другими органеллами может быть возможным объяснением появления субстратов SIRT3 в пероксисомах, однако для подтверждения потребуются дальнейшее экспериментальное исследование.

**Регуляция BACE1.** Что касается молекулярной функции при БА (табл. 1), активация ферментативной активности SIRT3 значительно ингибирует выработку A $\beta$  в головном мозге посредством ингибирования  $\beta$ -секретазы (BACE1) [84], фермента первой и скорость-лимитирующей стадии воздействия на предшественник бета-амилоида (APP). Путь, способствующий регуляторному воздействию SIRT3 на активность BACE1, был построен с использованием базы знаний WikiPathways с применением GeneMania и дополнительным анализом

литературы. Была создана рабочая модель механизма ингибирования выработки A $\beta$  в головном мозге (рис. 3).

В качестве первого шага SIRT3, активированный физическими упражнениями и/или ограничением калорий, деацетирует и активирует серин/треонин-протеинкиназу 11 (LKB1, STK11; табл. S2 в Приложении), за которым следует фосфорилирование AMPK и активация пути SIRT3-LKB1-AMPK [18]. Это приводит к активации PGC-1 $\alpha$  [84], репрессора BACE1, который подавляет выработку A $\beta$  в головном моз-



**Рис. 3.** Рабочая гипотеза механизма ингибирования синтеза A $\beta$  в головном мозге. Показана регуляция  $\beta$ -секретазы (BACE1, BACE) на основе сконструированного пути SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-BACE1. Изображение пути было создано при использовании базы знаний приложения WikiPathways в среде Cytoscape (3.7.2) и данных литературы [18, 84–87]

**Таблица 2.** Анализ обогащения пути с помощью приложения GeneMania в среде Cytoscape (3.7.2); все белки пути SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-BACE1 использовались в качестве запроса

Консолидированный путь	Ранг	Описание базы данных
Циркадные часы (CC)	10,55	Reactome React 24941.3
Болезнь Хантингтона	9,07	KEGG hsa05016
Сигнальные события, опосредованные HDAC класса I	7,85	Взаимодействие путей Database NCI-Nature Curated Data
Биология развития	7,83	Reactome React 111045.1
Метаболизм жирных кислот, триацилглицеридов и кетонных тел	5,02	Reactome React 22279.2
LKB1-регулирование	3,98	Взаимодействие путей Database NCI-Nature Curated Data
p38- $\alpha$ и p38- $\beta$ регулирование	3,57	Взаимодействие путей Database NCI-Nature Curated Data
Сеть факторов транскрипции ATF-2	2,57	Взаимодействие путей Database NCI-Nature Curated Data
Регуляция активности AMPK с помощью LKB1	1,91	Reactome React 21285.1
FSH	1,90	Netpath
Сигнальные события, опосредованные HDAC класса III	1,85	Взаимодействие путей Database NCI-Nature Curated Data
mTOR сигнальный путь	1,77	KEGG hsa04150
Сигнальный путь адипоцитокина	1,75	KEGG hsa04920
BDNF	0,96	IOB
PI3K-каскад	0,69	Reactome React 976.2
AMPK ингибирует активацию транскрипции посредством <i>chREBP</i>	0,15	Reactome React 1988.3

Примечание. Анализ проводился с использованием базы данных *H. sapiens* (обновление 13-07-2017) и включал все типы взаимодействий. Путь циркадных часов получил в анализе самый высокий ранг.

\* Ранг (вес) показывает прогностическую ценность, присвоенную GeneMania в отношении того, насколько указанные пути соответствуют набору данных, указанных в запросе, по сравнению другими данными (вне запроса).

ге [85] (рис. 3). Альтернативно, SIRT3 также активирует CREB, который непосредственно стимулирует промотор PGC-1 $\alpha$  [86]. PGC-1 $\alpha$  дополнительно требует присутствия PPARG для регулирования экспрессии BACE1. В соответствии с этой моделью уровень экспрессии PGC-1 $\alpha$  снижается в гиппокампе пациентов с БА по сравнению с контрольной группой соответствующего возраста [87], что подтверждает актуальность гипотетического пути SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-BACE1 (рис. 3).

Молекулярные функции пути SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-BACE1 (рис. 3) [18, 84–87] были исследованы с помощью анализа обогащения пути, выполненного с использованием приложения GeneMania. Интересно, что наивысший ранг (вес) получили циркадные часы (circadian clock, CC) (табл. 2). Это может быть связано с функцией PGC-1 $\alpha$ , который ока-

зывает ингибирующее действие на активность BACE1. PGC-1 $\alpha$  также является ключевым регулятором колебаний в циркадном цикле BMAL1 и CLOCK, координирует функции молекулярных часов и энергетического метаболизма у млекопитающих [87].

Интересно, что регулятор циркадного ритма мелатонин также активирует PGC-1 $\alpha$ , который далее взаимодействует с эстроген-зависимым рецептором  $\alpha$  (ERRA), непосредственно связанным с промотором SIRT3, и усиливает его транскрипционную активность [88]. Более того, CC регулируют ритм NAD<sup>+</sup>-зависимого SIRT3 через путь никотинамидрибозид (NR), который активируется доступностью питательных веществ в период кормления [89]. Нарушение CC может быть причиной заболеваний, связанных с системой взаимодействия субстратов SIRT3 (рис. 1, а) при БА, БП и БХ [90].

Интересно, что ацетилирование клеточных белков также демонстрирует суточные закономерности, при этом большинство ядерных и цитоплазматических белков ацетируются ночью, а митохондриальные белки модифицируются в течение дня. Ритмическое ацетилирование функционально связано с ритмическим деацетилированием, в то время как SIRT3 является основной митохондриальной деацетилазой белка [89]. Следовательно, SIRT3 может функционировать как ритмическая циркадная деацетилаза ядерных и митохондриальных белков с потенциальным влиянием на развитие нейродегенеративных заболеваний, которые могут быть ассоциированы с узлами пути SIRT3-BACE1.

Регулирование СС также происходит через путь SIRT3-FOXO3-CLOCK (рис. 3), где FOXO3 является основным регулятором. В условиях низкого уровня инсулина, характерного для стареющего мозга [91], он связывается непосредственно с промотором гена *CLOCK* и регулирует его транскрипцию [92]. Активация SIRT3 увеличивает экспрессию FOXO3 за счет их прямого физического взаимодействия, которое, однако, не зависит от активности деацетилазы SIRT3 [93, 94].

В заключение следует отметить, что функция SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-BACE1 тесно связана с путем СС, который нарушается при БА, БП и БХ и, по-видимому, является одной из причин развития этих заболеваний. Путь SIRT3-FOXO3-CLOCK, связанный с нарушением обмена веществ, продукцией ROS и аутофагией, также имеет отношение к патогенезу БА. Для узловых белков этих путей характерно взаимное регулирование, что является перспективным для разработки многоцелевой терапии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящий анализ сети взаимодействия субстратов основной митохондриальной деацетилазы, SIRT3, позволил выделить БА, БП, БХ и НАЖБП как заболевания, наиболее тесно ассоциированные с деацетилирующей активностью указанного фермента. Молекулярные функции, связанные с субстратами SIRT3, включают работу дыхательной цепи переноса электронов, цикл трикарбоновых кислот, метаболизм жирных кислот, триацилглицеридов и кетоновых тел. Деацетилирование SIRT3 в основном проходит в ткани бурого жира, где оно способствует адаптивному термогенезу, что также было продемонстрировано в ходе настоящего анализа.

SIRT3 деацетирует множество субъединиц комплекса I, II и даже комплекса V MRC, при

этом деацетилирование комплекса I является основным регуляторным звеном во всей сети взаимодействия анализируемых субстратов. Анализ подтверждает существование регуляторной петли обратной связи, управляемой NADH/NAD<sup>+</sup>, включающей SIRT3, комплекс I MRC и ацетил-КоА-синтетазу. SIRT3 также деацетирует и активирует ключевые ферменты цикла ТКК, такие как PDHA1, ответственную за переход от OXPHOS к гликолизу. Подавление экспрессии SIRT3 при старении приводит к снижению выработки энергии и в конечном итоге – к снижению уровня энергии в клетке. И, наконец, деацетилирование субъединиц комплексов II и V способствует регуляции продукции АТФ митохондриями. По-видимому, другие факторы также играют роль в такой регуляции, поскольку нокаут SIRT3 не приводит к тотальному нарушению митохондриальной биоэнергетики, что также было бы интересно исследовать в дальнейшем.

Интересно, что в настоящей работе было выявлено несколько недостаточно изученных ядерных субстратов, которые играют роль в поддержании структуры ядра и целостности генома, стабильности клеточного цикла и репарации ДНК. Деацетилирование LMNA и LMNB (синдром Хатчинсона–Гилфорда); HIF-1 $\alpha$  (эффект Варбурга), p53 (нейропротекция), DNAPK (NHEJ) и PARK7 (семейная форма БП) вместе с другими субстратами, задействованными в митохондриальной биоэнергетике, возможно, способствуют антивозрастной активности SIRT3.

В тканях головного мозга SIRT3 действует как репрессор BACE1, фермента, который катализирует решающий этап производства А $\beta$ , одного из маркеров БА. Сконструированный регуляторный путь SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-BACE1 создает модель ингибирующего воздействия SIRT3 на ферментативную активность BACE1 и предлагает ряд альтернативных узлов для мультитаргетного применения фармацевтических препаратов. Этот путь тесно связан с функцией СС, которая также ухудшается при развитии БА и является прямой причиной патологических нейродегенеративных изменений. Ряд дополнительных функций, ассоциированных с БА и СС, также осуществляются при участии пути SIRT3-FOXO3-CLOCK.

SIRT3 обладает несколькими механизмами протективного действия в головном мозге и печени, включая предотвращение повреждений митохондрий как последствий нарушения в дыхательной цепи переноса электронов, подавление ROS, ингибирование снижения мембранного потенциала митохондрий и регуляцию мито-

фагии. Повышение экспрессии и активности SIRT3 в головном мозге и печени представляется особенно полезным для уравнивания негативных последствий старения. Контроль функций комплекса I и II MRC в печени также полезен для лечения НАЖБП.

Фармакологическая активация SIRT3 в сочетании со стимулирующим эффектом регулярных физических упражнений видится привлекательным вариантом для снижения негативных последствий старения. Активации продукции энергии митохондриями на основе регуляции приоритетных узлов в сети взаимодействия SIRT3 с субстратами также является потенциальной стратегией борьбы с возрастными изменениями.

**Благодарности.** Исследование было выполнено при поддержке Biochemworld со., округ Уппсала, Швеция.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer ([www.springer.com/journal/10541](http://www.springer.com/journal/10541)), том 87, вып. 1, 2022.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lombard, D. B., Alt, F. W., Cheng, H.-L., Bunkenborg, J., Streeper, R. S., et al. (2007) Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation, *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 8807–8814, doi: 10.1128/mcb.01636-07.
- McDonnell, E., Peterson, B. S., Bomze, H. M., and Hirschey, M. D. (2015) SIRT3 regulates progression and development of diseases of aging, *Trends Endocrinol. Metab.*, **26**, 486–492, doi: 10.1016/j.tem.2015.06.001.
- Zhu, Y., Yan, Y., Principe, D. R., Zou, X., Vassilopoulos, A., et al. (2014) SIRT3 and SIRT4 are mitochondrial tumor suppressor proteins that connect mitochondrial metabolism and carcinogenesis, *Cancer Metab.*, **2**, 15, doi: 10.1186/2049-3002-2-15.
- Vassilopoulos, A., Pennington, J. D., Andresson, T., Rees, D. M., Bosley, A. D., et al. (2013) SIRT3 deacetylates ATP synthase F1 complex proteins in response to nutrient- and exercise-induced stress, *Antioxid. Redox Signal.*, **21**, 551–564, doi: 10.1089/ars.2013.5420.
- Brown, K., Xie, S., Qiu, X., Mohrin, M., Shin, J., et al. (2013) SIRT3 reverses aging-associated degeneration, *Cell Rep.*, **3**, 319–327, doi: 10.1016/j.celrep.2013.01.005.
- Braidy, N., Poljak, A., Grant, R., Jayasena, T., Mansour, H., et al. (2015) Differential expression of sirtuins in the aging rat brain, *Front Cell Neurosci.*, **9**, 167, doi: 10.3389/fncel.2015.00167.
- Weir, H. J. M., Murray, T. K., Kehoe, P. G., Love, S., Verdin, E. M., et al. (2012) CNS SIRT3 expression is altered by reactive oxygen species and in Alzheimer's disease, *PLoS One*, **7**, 3–9, doi: 10.1371/journal.pone.0048225.
- Oti, M. (2006) Predicting disease genes using protein–protein interactions, *J. Med. Genet.*, **43**, 691–698, doi: 10.1136/jmg.2006.041376.
- Poulose, N., and Raju, R. (2015) Sirtuin regulation in aging and injury, *Biochim. Biophys. Acta*, **1852**, 2442–2455, doi: 10.1016/j.bbdis.2015.08.017.
- Hallows, W. C., Lee S., and Denu, J. M. (2006) Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 10230–10235, doi: 10.1073/pnas.0604392103.
- Shimazu, T., Hirschey, M. D., Hua, L., Dittenhafer-Reed, K. E., Schwer, B., et al. (2010) SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production, *Cell Metab.*, **12**, 654–661, doi: 10.1016/j.cmet.2010.11.003.
- Bharathi, S. S., Zhang, Y., Mohsen, A. W., Uppala, R., Balasubramani, M., et al. (2013) Sirtuin 3 (SIRT3) protein regulates long-chain acyl-CoA dehydrogenase by deacetylating conserved lysines near the active site, *J. Biol. Chem.*, **288**, 33837–33847, doi: 10.1074/jbc.M113.510354.
- Finley, L. W. S. S., Carracedo, A., Lee, J., Souza, A., Egia, A., et al. (2011) SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1 $\alpha$  destabilization, *Cancer Cell*, **19**, 416–428, doi: 10.1016/j.ccr.2011.02.014.
- Sundaresan, N. R., Samant, S. A., Pillai, V. B., Rajamohan, S. B., and Gupta, M. P. (2008) SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70, *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 6384–6401, doi: 10.1128/mcb.00426-08.
- Qiu, X., Brown, K., Hirschey, M. D., Verdin, E., and Chen, D. (2010) Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation, *Cell Metab.*, **12**, 662–667, doi: 10.1016/j.cmet.2010.11.015.
- Yu, W., Dittenhafer-Reed, K. E., and Denu, J. M. (2012) SIRT3 protein deacetylates isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) and regulates mitochondrial redox status, *J. Biol. Chem.*, **287**, 14078–14086, doi: 10.1074/jbc.M112.355206.
- Schlicker, C., Gertz, M., Papatheodorou, P., Kachholz, B., Becker, C. F. W., et al. (2008) Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5, *J. Mol. Biol.*, **382**, 790–801, doi: 10.1016/j.jmb.2008.07.048.
- Pillai, V. B., Sundaresan, N. R., Kim, G., Gupta, M. M. P., Rajamohan, S. B., et al. (2010) Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway, *J. Biol. Chem.*, **285**, 3133–3144, doi: 10.1074/jbc.M109.077271.
- Yang, Y., Cimen, H., Han, M. J., Shi, T., Deng, J. H., et al. (2010) NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT3 regulates mitochondrial protein synthesis by deacetylation of the ribosomal protein MRPL10, *J. Biol. Chem.*, **285**, 7417–7429, doi: 10.1074/jbc.M109.053421.
- Hirschey, M. D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., et al. (2010) SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation, *Nature*, **464**, 121–125, doi: 10.1038/nature08778.
- Xue, L., Xu, F., Meng, L., Wei, S., Wang, J., et al. (2012) Acetylation-dependent regulation of mitochondrial ALDH2 activation by SIRT3 mediates acute ethanol-induced eNOS activation, *FEBS Lett.*, **586**, 137–142, doi: 10.1016/j.febslet.2011.11.031.
- Wang, Z., Inuzuka, H., Zhong, J., Liu, P., Sarkar, F. H., et al. (2012) Identification of acetylation-dependent regulatory

- mechanisms that govern the oncogenic functions of Skp2, *Oncotarget*, **3**, 1294-1300, doi: 10.18632/oncotarget.740.
23. Tseng, A. H. H., Shieh, S. S., and Wang, D. L. (2013) SIRT3 deacetylates FOXO3 to protect mitochondria against oxidative damage, *Free Radic. Biol. Med.*, **63**, 222-234, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.002.
  24. Jing, E., O'Neill, B. T., Rardin, M. J., Kleinriders, A., Ilkeyeva, O. R., et al. (2013) Sirt3 regulates metabolic flexibility of skeletal muscle through reversible enzymatic deacetylation, *Diabetes*, **62**, 3404-3417, doi: 10.2337/db12-1650.
  25. Cheng, Y., Ren, X., Gowda, A. S. P., Shan, Y., Zhang, L., et al. (2013) Interaction of Sirt3 with OGG1 contributes to repair of mitochondrial DNA and protects from apoptotic cell death under oxidative stress, *Cell Death Dis.*, **4**, 1-11, doi: 10.1038/cddis.2013.254.
  26. Samant, S. A., Zhang, H. J., Hong, Z., Pillai, V. B., Sundaresan, N. R., et al. (2014) SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 807-819, doi: 10.1128/mcb.01483-13.
  27. Lu, Z., Chen, Y., Aponte, A. M., Battaglia, V., Gucek, M., et al. (2015) Prolonged fasting identifies heat shock protein 10 as a sirtuin 3 substrate: Elucidating a new mechanism linking mitochondrial protein acetylation to fatty acid oxidation enzyme folding and function, *J. Biol. Chem.*, **290**, 2466-2476, doi: 10.1074/jbc.M114.606228.
  28. Rauh, D., Fischer, F., Gertz, M., Lakshminarasimhan, M., Bergbrede, T., et al. (2013) An acetylome peptide microarray reveals specificities and deacetylation substrates for all human sirtuin isoforms, *Nat. Commun.*, **4**, 2327-2337, doi: 10.1038/ncomms3327.
  29. Yang, H., Zhou, L., Shi, Q., Zhao, Y., Lin, H., et al. (2015) SIRT3-dependent GOT2 acetylation status affects the malate-aspartate NADH shuttle activity and pancreatic tumor growth, *EMBO J.*, **34**, 1110-1125, doi: 10.15252/embj.201591041.
  30. Rardin, M. J., Newman, J. C., Held, J. M., Cusack, M. P., Sorensen, D. J., et al. (2013) Label-free quantitative proteomics of the lysine acetylome in mitochondria identifies substrates of SIRT3 in metabolic pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 6601-6606, doi: 10.1073/pnas.1302961110.
  31. Hebert, A. S., Dittenhafer-Reed, K. E., Yu, W., Bailey, D. J., Selen, E. S., et al. (2013) Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial protein acetylome, *Mol. Cell.*, **49**, 186-199, doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.024.
  32. Sol, E. M., Wagner, S. A., Weinert, B. T., Kumar, A., Kim, H. S., et al. (2012) Proteomic investigations of lysine acetylation identify diverse substrates of mitochondrial deacetylase Sirt3, *PLoS One*, **7**, 1-9, doi: 10.1371/journal.pone.0050545.
  33. Consortium, T. U. (2021) UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D480-D489, doi: 10.1093/nar/gkaa1100.
  34. Amberger, J. S., Bocchini, C. A., Scott A. F., and Hamosh, A. (2019) OMIM.org: Leveraging knowledge across phenotype-gene relationships, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D1038-D1043, doi: 10.1093/nar/gky1151.
  35. Zuberi, K., Franz, M., Rodriguez, H., Montojo, J., Lopes, C. T., et al. (2013) GeneMANIA prediction server 2013 update, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 115-122, doi: 10.1093/nar/gkt533.
  36. Warde-Farley, D., Donaldson, S. L., Comes, O., Zuberi, K., Badrawi, R., et al. (2010) The GeneMANIA prediction server: Biological network integration for gene prioritization and predicting gene function, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 214-220, doi: 10.1093/nar/gkq537.
  37. Franz, M., Rodriguez, H., Lopes, C., Zuberi, K., Montojo, J., et al. (2018) GeneMANIA update 2018, *Nucleic Acids Res.*, **46**, W60-W64, doi: 10.1093/nar/gky311.
  38. Lopes, C. T., Franz, M., Kazi, F., Donaldson, S. L., Morris, Q., et al. (2010) Cytoscape Web: An interactive web-based network browser, *Bioinformatics*, **26**, 2347-2348, doi: 10.1093/bioinformatics/btq430.
  39. Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., et al. (2019) STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D607-D613, doi: 10.1093/nar/gky1131.
  40. Enright, A. J., Van Dongen, S., and Ouzounis, C. A. (2002) An efficient algorithm for large-scale detection of protein families, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1575-1584, doi: 10.1093/nar/30.7.1575.
  41. Chin, C.-H. H., Chen, S.-H. H., Wu, H.-H. H., Ho, C.-W. W., Ko, M.-T. T., et al. (2014) CytoHubba: Identifying hub objects and sub-networks from complex interactome, *BMC Syst. Biol.*, **8**, 1-7, doi: 10.1186/1752-0509-8-S4-S11.
  42. Bader, G. D., and Hogue, C. W. V. (2003) An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks, *BMC Bioinformatics*, **4**, 1-27, doi: 10.1186/1471-2105-4-2.
  43. Kutmon, M., Lotia, S., Evelo, C. T., and Pico, A. R. (2014) WikiPathways App for Cytoscape: Making biological pathways amenable to network analysis and visualization, *F1000Res.*, **3**, 152, doi: 10.12688/f1000research.4254.2.
  44. Liu, L., Peritore, C., Ginsberg, J., Kayhan, M., and Donmez, G. (2015) SIRT3 attenuates MPTP-induced nigrostriatal degeneration via enhancing mitochondrial antioxidant capacity, *Neurochem. Res.*, **40**, 600-608, doi: 10.1007/s11064-014-1507-8.
  45. Bader, J. S., Chaudhuri, A., Rothberg, J. M., and Chant, J. (2004) Gaining confidence in high-throughput protein interaction networks, *Nat. Biotechnol.*, **22**, 78-85, doi: 10.1038/nbt924.
  46. Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., et al. (2013) STRING v9.1: Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 808-815, doi: 10.1093/nar/gks1094.
  47. Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., et al. (2017) The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible, *Nucleic Acids Res.*, **45**, D362-D368, doi: 10.1093/nar/gkw937.
  48. Van Dongen, S. M. (2000) *Graph Clustering by Flow Simulation*, Utrecht University Repository. Dissertation [English]. Utrecht University, Utrecht.
  49. Ahn, B. H., Kim, H. S., Song, S., In, H. L., Liu, J., et al. (2008) A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14447-14452, doi: 10.1073/pnas.0803790105.
  50. Fujino, T., Kondo, J., Ishikawa, M., Morikawa, K., and Yamamoto, T. T. (2001) Acetyl-CoA Synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate, *J. Biol. Chem.*, **276**, 11420-11426, doi: 10.1074/jbc.M008782200.
  51. Bao, J., Scott, I., Lu, Z., Pang, L., Dimond, C. C., et al. (2010) SIRT3 is regulated by nutrient excess and modulates hepatic susceptibility to lipotoxicity, *Free Radic. Biol. Med.*, **49**, 1230-1237, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.009.
  52. Finley, L. W. S., Haas, W., Desquiere-Dumas, V., Wallace, D. C., Procaccio, V., et al. (2011) Succinate dehydroge-

- nase is a direct target of sirtuin 3 deacetylase activity, *PLoS One*, **6**, 4-9, doi: 10.1371/journal.pone.0023295.
53. Cimen, H., Han, M.-J., Yang, Y., Tong, Q., Koc, H., et al. (2010) Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria, *Biochemistry*, **49**, 304-311, doi: 10.1021/bi901627u.
  54. Yang, W., Nagasawa, K., Münch, C., Xu, Y., Satterstrom, K., et al. (2016) Mitochondrial sirtuin network reveals dynamic SIRT3-dependent deacetylation in response to membrane depolarization, *Cell*, **167**, 985-1000, e21, doi: 10.1016/j.cell.2016.10.016.
  55. Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J. P., and Gibson, G. E. (2005) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: Mechanistic implications, *Ann. Neurol.*, **57**, 695-703, doi: 10.1002/ana.20474.
  56. Ozden, O., Park, S.-H., Wagner, B. A., Song, H. Y., Zhu, Y., et al. (2014) SIRT3 deacetylates and increases pyruvate dehydrogenase activity in cancer cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **76**, 163-172, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.001.
  57. Warburg, O., Wind, F., Negelein, E., and Shirlaw, J. T. (1927) The metabolism of tumors in the body, *J. Gen. Physiol.*, **8**, 519-530, doi: 10.1085/jgp.8.6.519.
  58. Stacpoole, P. W. (2012) The pyruvate dehydrogenase complex as a therapeutic target for age-related diseases, *Aging Cell*, **11**, 371-377, doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00805.x.
  59. Zhou, Q., Lam, P. Y., Han, D., and Cadenas, E. (2009) Activation of c-Jun-N-terminal kinase and decline of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity during brain aging, *FEBS Lett.*, **583**, 1132-1140, doi: 10.1016/j.febslet.2009.02.043.
  60. Scher, M. B., Vaquero, A., and Reinberg, D. (2007) SirT3 is a nuclear NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress, *Genes Dev.*, **21**, 920-928, doi: 10.1101/gad.1527307.
  61. Cooper, H. M., and Spelbrink, J. N. (2008) The human SIRT3 protein deacetylase is exclusively mitochondrial, *Biochem. J.*, **411**, 279-285, doi: 10.1042/BJ20071624.
  62. Gurd, B. J., Holloway, G. P., Yoshida, Y., and Bonen, A. (2012) In mammalian muscle, SIRT3 is present in mitochondria and not in the nucleus; and SIRT3 is upregulated by chronic muscle contraction in an adenosine monophosphate-activated protein kinase-independent manner, *Metabolism*, **61**, 733-741, doi: 10.1016/j.metabol.2011.09.016.
  63. Védrenne, V., Gowher, A., De Lonlay, P., Nitschke, P., Serre, V., et al. (2012) Mutation in PNPT1, which encodes a Polyribonucleotide Nucleotidyltransferase, impairs RNA import into mitochondria and causes respiratory-chain deficiency, *Am. J. Hum. Genet.*, **91**, 912-918, doi: 10.1016/j.ajhg.2012.09.001.
  64. Palmieri, L., Pardo, B., Lasorsa, F. M., del Arco, A., Kobayashi, K., et al. (2001) Citrin and aralar1 are Ca<sup>2+</sup>-stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria, *EMBO J.*, **20**, 5060-5069, doi: 10.1093/emboj/20.18.5060.
  65. Galmiche, L., Serre, V., Beinat, M., Zossou, R., Assouline, Z., et al. (2012) Toward genotype phenotype correlations in GFM1 mutations, *Mitochondrion*, **12**, 242-247.
  66. Fukumura, S., Ohba, C., Watanabe, T., Minagawa, K., Shimura, M., et al. (2015) Compound heterozygous GFM2 mutations with Leigh syndrome complicated by arthrogryposis multiplex congenita, *J. Hum. Genet.*, **60**, 509-513, doi: 10.1038/jhg.2015.57.
  67. Perli, E., Pisano, A., Glasgow, R. I. C., Carbo, M., Hardy, S. A., et al. (2019) Novel compound mutations in the mitochondrial translation elongation factor (TSFM) gene cause severe cardiomyopathy with myocardial fibro-adipose replacement, *Sci. Rep.*, **9**, 1-13, doi: 10.1038/s41598-019-41483-9.
  68. Shi, H., Hayes, M., Kirana, C., Miller, R., Keating, J., et al. (2012) TUFM is a potential new prognostic indicator for colorectal carcinoma, *Pathology*, **44**, 506-512, doi: 10.1097/PAT.0b013e3283559cbe.
  69. Sengupta, A., and Halder, D. (2018) Human sirtuin 3 (SIRT3) deacetylates histone H3 lysine 56 to promote nonhomologous end-joining repair, *DNA Repair (Amst)*. **61**, 1-16, doi: 10.1016/j.dnarep.2017.11.003.
  70. Nakamura, Y., Ogura, M., Tanaka, D., and Inagaki, N. (2008) Localization of mouse mitochondrial SIRT proteins: Shift of SIRT3 to the nucleus by co-expression with SIRT5, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **366**, 174-179, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.11.122.
  71. Redwood, A. B., Perkins, S. M., Vanderwaal, R. P., Feng, Z., Biehl, K. J., et al. (2011) A dual role for A-type lamins in DNA double-strand break repair, *Cell Cycle*, **10**, 2549-2560, doi: 10.4161/cc.10.15.16531.
  72. Murray-Nerger, L. A., Justice, J. L., Rekapalli, P., Hutton, J. E., and Cristea, I. M. M. (2021) Lamin B1 acetylation slows the G1 to S cell cycle transition through inhibition of DNA repair, *Nucleic Acids Res.*, **49**, 2044-2064, doi: 10.1093/nar/gkab019.
  73. Maynard, S., Keijzers, G., Akbari, M., Ezra, M. B., Hall, A., et al. (2019) Lamin A/C promotes DNA base excision repair, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 11709-11728, doi: 10.1093/nar/gkz912.
  74. Laemmle, A., Lechleiter, A., Roh, V., Schwarz, C., Portmann, S., et al. (2012) Inhibition of SIRT1 impairs the accumulation and transcriptional activity of HIF-1 $\alpha$  protein under hypoxic conditions, *PLoS One*, **7**, e33433, doi: 10.1371/journal.pone.0033433.
  75. Joo, H.-Y., Yun, M., Jeong, J., Park, E.-R., Shin, H.-J., et al. (2015) SIRT1 deacetylates and stabilizes hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) via direct interactions during hypoxia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **462**, 294-300, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.119.
  76. Xiong, Y., Wang, L., Wang, S., Wang, M., Zhao, J., et al. (2015) SIRT3 deacetylates and promotes degradation of P53 in PTEN-defective non-small cell lung cancer, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **144**, 189-198, doi: 10.1007/s00432-017-2537-9.
  77. Lee, J., Kim, Y., Liu, T., Hwang, Y. J., Hyeon, S. J., et al. (2018) SIRT3 deregulation is linked to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease, *Aging Cell*, **17**, 1-12, doi: 10.1111/ace1.12679.
  78. Polischouk, A. G., Cedervall, B., Ljungquist, S., Flygare, J., Hellgren, D., et al. (1999) DNA double-strand break repair, DNA-PK, and DNA ligases in two human squamous carcinoma cell lines with different radiosensitivity, *Int. J. Radiat. Oncol.*, **43**, 191-198, doi: 10.1016/S0360-3016(98)00362-9.
  79. Chaplin, A. K., Hardwick, S. W., Liang, S., Kefala Stavridi, A., Hnizda, A., et al. (2021) Dimers of DNA-PK create a stage for DNA double-strand break repair, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **28**, 13-19, doi: 10.1038/s41594-020-00517-x.
  80. Park, S. J., Gavrilova, O., Brown, A. L., Soto, J. E., Bremner, S., et al. (2017) DNA-PK promotes the mitochondrial, metabolic, and physical decline that occurs during aging, *Cell Metab.*, **25**, 1135-1146.e7, doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.008.
  81. Sui, J., Zhang, S., and Chen, B. P. C. (2020) DNA-dependent protein kinase in telomere maintenance and protection, *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **25**, 1-14, doi: 10.1186/s11658-020-0199-0.
  82. Schrader, M., Kamoshita, M., and Islinger, M. (2020) Organellar interplay-peroxisome interactions in health and

- disease, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **43**, 71-89, doi: 10.1002/jimd.12083.
83. Palacios, O. M., Carmona, J. J., Michan, S., Chen, K. Y., Manabe, Y., et al. (2009) Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1 $\alpha$  in skeletal muscle, *Aging (Albany NY)*, **1**, 771-783, doi: 10.18632/aging.100075.
  84. Ramesh, S., Govindarajulu, M., Lynd, T., Briggs, G., Adamek, D., et al. (2018) SIRT3 activator Honokiol attenuates  $\beta$ -amyloid by modulating amyloidogenic pathway, *PLoS One*, **13**, 1, doi: 10.1371/journal.pone.0190350.
  85. Shi, T., Wang, F., Stieren, E., and Tong, Q. (2005) SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes, *J. Biol. Chem.*, **280**, 13560-13567, doi: 10.1074/jbc.M414670200.
  86. Katsouri, L., Parr, C., Bogdanovic, N., Willem, M., and Sastre, M. (2011) PPAR $\gamma$  co-activator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) reduces amyloid- $\beta$  generation through a PPAR $\gamma$ -dependent mechanism, *J. Alzheimer's Dis.*, **25**, 151-162, doi: 10.3233/JAD-2011-101356.
  87. Liu, C., Li, S., Liu, T., Borjigin, J., and Lin, J. D. (2007) Transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  integrates the mammalian clock and energy metabolism, *Nature*, **447**, 477-481, doi: 10.1038/nature05767.
  88. Song, C., Zhao, J., Zhang, J., Mao, T., Fu, B., et al. (2017) SIRT3-dependent mitochondrial oxidative stress in sodium fluoride-induced hepatotoxicity and salvage by melatonin, *BioRxiv*, doi: 10.1101/107813.
  89. Mauvoisin, D., Atger, F., Dayon, L., Núñez Galindo, A., Wang, J., et al. (2017) Circadian and feeding rhythms orchestrate the diurnal liver acetylome, *Cell Rep.*, **20**, 1729-1743, doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.065.
  90. Kondratova, A. A., and Kondratov R. V. (2012) The circadian clock and pathology of the ageing brain, *Nat. Rev. Neurosci.*, **13**, 325-335, doi: 10.1038/nrn3208.
  91. Tomita, T. (2017) Aberrant proteolytic processing and therapeutic strategies in Alzheimer's disease, *Adv. Biol. Regul.*, **64**, 33-38, doi: 10.1016/j.jbior.2017.01.001.
  92. Chaves, I., van der Horst, G. T. J., Schellevis, R., Nijman, R. M., Koerkamp, M. G., et al. (2014) Insulin-FOXO3 signaling modulates circadian rhythms via regulation of clock transcription, *Curr. Biol.*, **24**, 1248-1255, doi: 10.1016/j.cub.2014.04.018.
  93. Tong, W., Ju, L., Qiu, M., Xie, Q., Chen, Y., et al. (2016) Liraglutide ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by enhancing mitochondrial architecture and promoting autophagy through the SIRT1/SIRT3-FOXO3a pathway, *Hepatol. Res.*, **46**, 933-943, doi: 10.1111/hepr.12634.
  94. Jacobs, K. M., Pennington, J. D., Bisht, K. S., Aykin-Burns, N., Kim, H.-S., et al. (2008) SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the mitochondria, as well as increases FOXO3a dependent gene expression, *Int. J. Biol. Sci.*, **4**, 4291-4299, doi: 10.7150/ijbs.4.291.

## FOCUS ON MOLECULAR FUNCTIONS OF ANTI-AGING DEACETYLASE SIRT3

**Jarmila Nahálková**

*Biochemistry, Molecular, and Cell Biology Unit, Biochemworld Co., 74394 Skyttorp, Uppsala County, Sweden; e-mail: jarmila.nahalkova@biochemworld.net*

SIRT3 is a protein lysine deacetylase with a prominent role in the maintenance of mitochondrial integrity, which is a vulnerable target in many diseases. Intriguingly, cellular aging is reversible just by SIRT3 overexpression, which raises many questions about the role of SIRT3 in the molecular anti-aging mechanisms. Therefore, functions of SIRT3 were analyzed through the interaction network of 407 substrates collected by data mining. Results of the pathway enrichment and gene function prediction confirmed functions in the primary metabolism and mitochondrial ATP production. However, it also suggested involvement in thermogenesis, brain-related neurodegenerative diseases Alzheimer's (AD), Parkinson's, Huntington's disease (HD), and non-alcoholic fatty liver disease. The protein node prioritization analysis identified subunits of the complex I of the mitochondrial respiratory chain (MRC) as the nodes with the main regulatory effect within the entire interaction network. Additional high-ranked nodes were succinate dehydrogenase subunit B (SDHB), complex II, and ATP5F1, complex V of MRC. The analysis supports existence of the NADH/NAD<sup>+</sup> driven regulatory feedback loop between SIRT3, complex I (MRC), and acetyl-CoA synthetases, and existence of the nuclear substrates of SIRT3. Unexplored functions of SIRT3 substrates such as LMNA and LMNB; HIF-1 $\alpha$ , p53, DNA-PK, and PARK7 are highlighted for further scientific advances. SIRT3 acts as a repressor of BACE1 through the SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-BACE1 (SIRT3-BACE1), which functions are fitted the best by the Circadian Clock pathway. It forms a new working hypothesis as the therapeutic target for AD treatment. Other important pathways linked to SIRT3 activity are highlighted for therapeutic interventions.

**Keywords:** SIRT3, NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase, protein interaction network, pathway enrichment analysis, aging, respiratory electron transport chain, mitochondria, age-related disease